

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



21 JAN 2005

(43) 国際公開日
2004 年1 月29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/009829 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12P 13/12, C07C 319/28, 323/58

(ISHIKAWA, Takahiro) [JP/JP]; 〒949-2302 新潟県 中
頸城郡 中郷村大字藤沢950 日本曹達株式会社 二本
木工場内 Niigata (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009268

(22) 国際出願日: 2003 年7 月22 日 (22.07.2003)

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052
東京都 港区 赤坂二丁目8 番5 号若林ビル3 階 Tokyo
(JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-214508 2002 年7 月23 日 (23.07.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本
曹達株式会社 (NIPPON SODA CO., LTD) [JP/JP]; 〒
100-8165 東京都 千代田区 大手町二丁目2 番1 号
Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 洋一
(KOBAYASHI, Yoichi) [JP/JP]; 〒250-0216 神奈川県
小田原市 高田345 日本曹達株式会社 小田原研究所
内 Kanagawa (JP). 小野 逸平 (ONO, Ippei) [JP/JP]; 〒
949-2302 新潟県 中頸城郡 中郷村大字藤沢950 日本
曹達株式会社 二本木工場内 Niigata (JP). 早川 公一
(HAYAKAWA, Koichi) [JP/JP]; 〒250-0216 神奈川県 小
田原市 高田345 日本曹達株式会社 小田原研究所内
Kanagawa (JP). 水井 良典 (MIZUI, Yoshinori) [JP/JP];
〒250-0216 神奈川県 小田原市 高田345 日本曹達
株式会社 小田原研究所内 Kanagawa (JP). 石川 高広

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF METHIONINE

(54) 発明の名称: メチオニンの製造法

(57) Abstract: The invention relates to a practical process for the production of methionine by converting a raw material capable of forming methionine through hydrolysis into methionine by the use of a biocatalyst, which permits repeated use of the biocatalyst, increased accumulation of methionine dissolved in the reaction fluid, and recovery of methionine in the form of a solid product from the reaction fluid, specifically, a process for the production of methionine which comprises the first step of hydrolyzing a raw material capable of forming methionine through hydrolysis, e.g., 2-amino-4-methylthiobutyronitrile or 2-amino-4-methylthiobutanamide, in an aqueous ammonia solution with a biocatalyst to form a methionine-containing aqueous ammonia solution, the second step of separating the methionine-containing aqueous ammonia solution from the biocatalyst, and the third step of distilling off ammonia from the resulting methionine-containing aqueous ammonia solution to precipitate and separate crystals of methionine.

(57) 要約: 本発明は、加水分解によりメチオニンを生成しうる物質を原料として、生体触媒を用いてメチオニンに変換する際、生体触媒の繰り返し使用が可能であって、反応液中のメチオニンの溶解蓄積量を増加させるとともに、反応液からメチオニンを固形品として得る実用的なメチオニンの製造法である。詳しくは、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド等の加水分解によりメチオニンを生成しうる原料物質をアンモニア水溶液中で生体触媒によって加水分解して含メチオニンアンモニア水溶液に変換する第1工程、前記第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液を生体触媒と分離する第2の工程、前記第2工程で分離された含メチオニンアンモニア水溶液よりアンモニアを留去しメチオニン結晶を析出・分離する第3工程によりメチオニンを製造する方法である。

WO 2004/009829 A1

明 細 書

メチオニンの製造法

5 技術分野

本発明は、医薬品や飼料添加剤として利用されているメチオニン結晶の製造法に関する。メチオニンは特に飼料添加物市場において固形（結晶）品で提供されることが求められている。

10 背景技術

生体触媒のニトリル加水分解活性を用いた 2-アミノ酸の製造方法としては、2-アミノニトリルや 2-アミノアミドを原料とする方法（特公昭 58-15120 号公報、特表昭 63-500004 号公報、特開平 2-31694 号公報、特表平 3-500484 号公報、特公平 3-16118 号公報、WO 02/08439、特開 2002-34593、US-6417395）及びシアンヒドリンを原料とする方法（特開平 9-140391）が知られている。しかしながら、いずれの方法においても、メチオニンのような水溶解度の低い固形 2-アミノ酸を生体触媒と効率よく分離精製する実用的方法については開示されていない。

20 また、ホルムアルデヒド、青酸及びアンモニアの反応で得られるグリシノニトリルからグリシンの微生物学的製造において、反応液中に生成するアンモニアを分離する方法が知られている（特開 2001-258586、特開 2001-299377、特開 2001-340096、特開 2001-340097）が、この方法におけるアンモニア分離は、
25 反応による pH の上昇を抑えるために、ニトリルの加水分解によって生成するアンモニアを分離するものであり、さらにまた、グリシンは水溶

解度が高い（25℃で25g／100g・H₂O）のでアンモニアを留去することでグリシンを晶析させるものでもない。

本発明の課題は、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド等の加水分解によりメチオニン
5 を生成しうる物質を原料として、生体触媒を用いてメチオニンに変換する際、生体触媒の繰り返し使用が可能であって、反応液中のメチオニンの溶解蓄積量を増加させるとともに、反応液からメチオニンを固形品として容易に単離しうる実用的なメチオニンの製造法を提供することにある。

10 本発明者らは、高ニトリラーゼ活性を安定的に持続しうるニトリラーゼ産生菌アースロバクター・エスピー（*Arthrobacter* sp.）NSSC104（FERM BP-5829）及びアースロバクター・エスピー（*Arthrobacter* sp.）NSSC204（FERM BP-7662）を既に見い出している。これらニトリ
15 ラーゼ産生菌を生体触媒として用いて、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを加水分解してメチオニンを得る製造技術を検討する過程で、メチオニンの水に対する溶解度が低い（25℃で3.38g／100g・H₂O、50℃で6.07g／100g・H₂O）ため、反応開始直後から反応液中にメチオニン結晶が析出してしまい、これが生体触
20 媒と凝集して、メチオニン析出晶と生体触媒と反応液との3成分を効率よく分離することが困難となり、生体触媒を高い回収率でリサイクルすることが困難であるという問題に直面した。一方、反応中、メチオニンを析出させないで、反応液（水）に溶解させた状態を保って、生体触媒を分離回収することは可能であるが、この場合は、メチオニンの水に対する溶解度が低いため、メチオニンの蓄積濃度を5%未満というきわめて
25 低い濃度に維持する必要がある、反応液中のメチオニンの溶解蓄積量

を増加させることができず、生産性の極めて低い製造技術となり、実用性に乏しいことがわかった。

上記の問題は、アミダーゼ産生菌を生体触媒として用いて、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミドを加水分解してメチオニンを得る場合においても、同様に発生する。

そこで、本発明者らは、上記本発明の課題を同時に解決すべく鋭意検討を重ねた結果、反応液中のメチオニンの溶解蓄積量を増加させるには、反応液中にアンモニアを存在させればよいと考え、メチオニンに対するアンモニアのモル比を0、1、1.5、2、2.5、とした5種類の溶液を調製し、5～50℃でメチオニンの溶解度を調べる予備実験を行った。図1に示される結果から、反応液中にアンモニアをメチオニンに対するモル比として過剰量存在させることによって、メチオニンの溶解度が増加することを見出し、メチオニンを溶解状態で反応液中に5～30重量%蓄積させ、菌体触媒を100%回収するシステムを考案した。

メチオニンを20重量%程度水に溶解させるにはNaOHやKOH等の無機アルカリを添加することによっても可能であるが、この場合は、メチオニンの固形遊離体としての製品を得るにあたって、酸を用いて中和する必要があり、この際、無機塩廃棄物が大量に発生し、これを除去する操作が別途必要になるという問題が生ずる。

また、メチオニンの固形遊離体の分離回収は、加水分解反応槽から生体触媒と分離後排出されるメチオニンを含むアンモニア水溶液（含メチオニンアンモニア水溶液）からアンモニアを留去し、析出するメチオニン結晶を採取することにより容易に行うことができる。メチオニン結晶を分離回収した母液は、残存原料2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルや2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド、メチオニン、アンモニアを少量含んでいるので、加水分解反応槽にリサイクルすること

が望ましく、これによって廃棄物の出ないプロセスを完結することができる。本発明は以上の知見に基づき完成に至ったものである。

発明の開示

5 すなわち本発明は、

[1] (1) 加水分解によりメチオニンを生成しうる原料物質をアンモニア水溶液中で加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して含メチオニンアンモニア水溶液に変換する第1の工程、(2) 前記第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液を生体触媒と分離する第
10 2の工程、(3) 前記第2の工程で分離された含メチオニンアンモニア水溶液よりアンモニアを留去しメチオニン結晶を析出・分離する第3の工程を有することを特徴とするメチオニンの製造法や、

[2] 原料物質としての2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルをアンモニア水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって
15 加水分解する[1]記載のメチオニンの製造法や、

[3] 原料物質としての2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミドをアンモニア水溶液中でアミド加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解する[1]記載のメチオニンの製造法や、

[4] アンモニア水溶液として、第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液中のメチオニン量の1.5～10倍当量のアンモニアを含む水溶液を用いる[1]～[3]のいずれか記載のメチオニンの製造
20 法や、

[5] 第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液中のメチオニン濃度が5～30重量%である[1]～[4]のいずれか記載のメチ
25 オニンの製造法や、

[6] 生体触媒を再利用する[1]～[5]のいずれか記載のメチオニ

ンの製造法や、

〔 7 〕 生体触媒として、固定化菌体を用いる〔 1 〕 ～〔 6 〕 のいずれか記載のメチオニンの製造法や、

〔 8 〕 メチオニン結晶を分離回収した母液、及び留去されたアンモニア
5 を加水分解反応に再利用する〔 1 〕 ～〔 7 〕 のいずれか記載のメチオニンの製造法や、

〔 9 〕 第 1 の工程を加圧下で実施する〔 1 〕 ～〔 8 〕 のいずれか記載のメチオニンの製造法
に関する。

10

図面の簡単な説明

第 1 図、メチオニンに対するアンモニアのモル比を 0、1、1.5、2、2.5 とした 5 種類の溶液における 5 ～ 50℃でのメチオニンの溶解度を調べた結果を示す図である。

15 第 2 図は、本発明のメチオニンの製造法における、廃棄物でないプロセスの概略を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のメチオニンの製造法としては、（ 1 ）加水分解によりメチオ
20 ニンを生成しうる原料物質をアンモニア水溶液中で加水分解活性を有する生体触媒、好ましくは、原料物質としての 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルをアンモニア水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒や原料物質としての 2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミドをアンモニア水溶液中でアミド加水分解活性を有する生体触媒によ
25 って加水分解して含メチオニンアンモニア水溶液に変換する第 1 の工程、
（ 2 ）前記第 1 の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液を生体

触媒と分離する第2の工程、(3)前記第2の工程で分離された含メチオニンアンモニア水溶液よりアンモニアを留去しメチオニン結晶を析出・分離する第3の工程を有する方法であれば特に制限されるものではないが、例えば図2に示されるように、生体触媒を再利用するなど廃棄物のでないプロセスとすることが好ましい。

上記2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルや2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド以外の加水分解によりメチオニンを生成する原料物質としては、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸低級アルキルエステル、メチルチオエチルヒダントイン、メチルチオエチルヒダントイン酸、メチルチオエチルヒダントイン酸アミド等を挙げることができる。

2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルをアンモニア水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して含メチオニンアンモニア水溶液に変換する第1の工程で使用される生体触媒としては、アンモニア水溶液等の水溶液中でニトリルを加水分解する活性を有する微生物等の生体触媒であれば特に制限されるものではなく、かかる生体触媒としては、例えばアースロバクター (Arthrobacter) 属、バリオボラックス (Variovorax) 属等に属する微生物を挙げることができ、これらの中でも特に、アースロバクター・エスピーNSSC104、アースロバクター・エスピーNSSC204、及びバリオボラックス・パラドキサス (Variovorax paradoxus) IAM12374を好適に例示することができる。

アースロバクターNSSC104は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、受託番号FERM BP-5829として1996年2月6日付で寄託されており、その菌学的性質についてはWO97/32030に記載さ

れている。また、アースロバクターNSSC204は同じく独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、受託番号FERM BP-7662として2000年6月22日付で寄託されており、その菌学的性質についてはWO02/08439に記載されている。また、バリオボラックス・パラドキサスIAM12374は東京大学分子細胞生物研究所より容易に入手でき、その菌学的性質についてはインターナショナル・ジャーナル・オブ・システマチック・バクテリオロジー（International Journal of Systematic Bacteriology）第41巻、445-450頁（1991年）に記載されている。

10 2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミドをアンモニア水溶液中でアミド加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して含メチオニアンアンモニア水溶液に変換する第1の工程で使用される生体触媒としては、アンモニア水溶液等の水溶液中でアミドを加水分解する活性を有する微生物等の生体触媒であれば特に制限されるものではなく、かかる生
15 体触媒としては、例えばロドコッカス・ロドクロス（*Rhodococcus rhodochrous*）IFO15564を好適に例示することができる。

ロドコッカス・ロドクロス（*Rhodococcus rhodochrous*）IFO15564は、独立行政法人製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源センター（NBRIC）より容易に入手でき、その菌学的性質についてはテトラヘドロン・レターズ（Tetrahedron Letters）第32巻、1343-1346頁に記載されている。
20

これらの微生物の培養は、酵素誘導物質、微生物が資化しうる炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要ならば有機栄養源を含む通常の培地で行われる。酵素誘導物質としては、イソブチロニトリル、2-アミノベンゾニトリル等のニトリル化合物、 ϵ -カプロラクタムなどの環状アミ
25 ド化合物等が使用され、特に2-アミノベンゾニトリルが好ましい。炭

素源としてはグルコース等の炭水化物、エタノール等のアルコール類、有機酸その他が適宜用いられる。窒素源としては、アミノ酸、硝酸塩、アンモニウム塩その他が用いられる。無機イオンとしては、リン酸イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、硫酸イオン、鉄イオン、その他が必要に応じて使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸など及びこれらを含むコーンスチープリカー、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、その他が適宜用いられる。培養は好氣的条件下に、pH 6 ~ 9、温度 25 ~ 37℃の適当な範囲に制御しつつ行えばよい。

- 10 本発明に用いられる生体触媒としては、上記のように培養した菌体又はその菌体から調製した固定化菌体、粗酵素もしくは固定化酵素などの菌体処理物が挙げられる。菌体又は酵素を固定化する場合は担体結合法、包括法等の通常行われる固定化技術を適用できる。酵素または粗酵素を調製する場合は、菌体を超音波、高圧ホモジナイザー等によって破碎した後に、硫酸塩析、クロマトグラフィー等の通常行われる酵素精製技術が適用できる。また反応に用いた菌体等の生体触媒は実質的な活性の低下なしに繰り返し加水分解反応に使用することができることから、再利用することが好ましい。

- 20 かかる生体触媒による加水分解反応は、アンモニアを含む水性溶媒中で上記の生体触媒を 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド等の加水分解によりメチオニンを生成する原料物質に作用させることによって行われる。生体触媒は乾燥重量に換算して、通常 0.1 ~ 10 重量%、好ましくは 1 ~ 6 重量%の濃度で使用する。また、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド等の原料物質は、0.01 ~ 50 重量%の濃度で反応に使用され、必要ならば反応の間、逐次

添加あるいは連続添加することができる。また、アンモニアを含む水性溶媒としては、アンモニア水を主成分とする有機溶媒を含んでもよい水性溶媒で、アミン等の有機塩基、有機酸あるいは無機塩基を含んでも良い。アンモニアは0.5～30重量%、好ましくは0.8～10重量%
5 の濃度の水溶液で使用し、また、メチオニンの蓄積濃度の1.5～10倍当量のアンモニアを含む水溶液を用いることができる。さらに、アンモニアの溶解量を高め、反応液中のメチオニンの溶解蓄積量を増加させるために、加水分解反応を加圧下で実施することもできる。

上記第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液を生体触媒
10 と分離する第2の工程においては、含メチオニンアンモニア水溶液を生体触媒と分離して反応系外に排出することもできるし、生体触媒を含メチオニンアンモニア水溶液と分離して反応系外に排出することもできる。このような加水分解反応終了後の含メチオニンアンモニア水溶液と生体触媒との分離方法としては、公知の固液分離方法であれば特に制限され
15 ず、例えば濾過、遠心分離、限外濾過濃縮法などによって行うことができ、回収された生体触媒は、前記のように、繰り返し加水分解反応に使用することができる。また、固定化菌体や固定化酵素を使用した場合の含メチオニンアンモニア水溶液と生体触媒との分離は、特別な固液分離手段は必要なく、反応槽の排出口にストレーナー等の簡単な粗目のフィ
20 ルターを設けて固定化生体触媒の反応槽からの流出を防止すればよい。

上記第2の工程で分離された含メチオニンアンモニア水溶液よりアンモニアを留去しメチオニン結晶を析出・分離する第3の工程における含メチオニンアンモニア水溶液からのアンモニア留去は、加圧脱気・減圧脱気あるいは加熱留去によって行われ、メチオニンに対して過剰量のアンモニアを一定量留去すればメチオニンが晶析させることができる。留
25 去されたアンモニアはメチオニンと等モル分を除いて、加水分解反応に

再利用することができる。再利用できない除外されたアンモニアは、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド等の原料物質を合成するのに使用することができる。このように、晶析したメチオニンは濾過・遠心分離器等の固液分離機を用いて固形品として回収することができ、メチオニン結晶回収分離後の母液は、残存2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド等の原料物質、メチオニン、アンモニア等を少量含んでいるので、加水分解反応にリサイクルすることができる。

10 本発明で製造されるメチオニンは、用いる生体触媒の光学選択性によってD型、L型あるいはラセミ体のメチオニンとして得ることができ、生成分離されたメチオニン結晶は、更に精製あるいは粒度調整を必要に応じて行うことができる。

15 以下、実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例1 (NSSC204株によるDL-メチオニンの製造)

(NSSC204株の培養)

酵母エキス0.5%、グルコース0.5%、リン酸水素二カリウム0.1%、リン酸二水素カリウム0.1%、食塩0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.02%、硫酸第一鉄0.001%及び2-アミノベンゾニトリル0.03%を含む培地2mlを試験管にとり121℃で20分間滅菌した。この試験管にアースロバクターNSSC204株を一白金耳植菌し、33℃で一晩振盪培養し前培養物を調製した。次いで、コーン
25 スチープリカー（濾過滅菌）2.0%、スクロース（121℃で20分間滅菌）1.0%、2-アミノベンゾニトリル（121℃で20分間滅

菌) 0.03%を含むpH7.2(2N苛性ソーダで調整)の培地20mlを100ml容量のバッフル付き三角フラスコに入れ、上記の前培養物0.2mlを植え継ぎ、さらに4日間33℃で振盪培養した。

(DL-メチオニンの生成)

- 5 得られたアースロバクターNSSC204株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体濃度で0.1%(W/W)となるように133mMの2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルと25mM 1,3-ジアミノプロパンを含む水溶液(pH11.2)に懸濁し、35℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加4時間
- 10 後に遠心分離して菌体を除去し、残った反応液に含まれるメチオニンの濃度を高速液体クロマトグラフィー(カラム:TSKgel ODS-80TM、キャリア:エタノール/水/トリフルオロ酢酸=5/95/0.04)を用いて定量した結果、125mMのDL-メチオニンの蓄積を確認した。

15

実施例2 (NSSC204株によるDL-メチオニンの連続生産)

- 実施例1で得られたアースロバクターNSSC204株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体として2%(W/W)濃度となるように10%(W/W)DL-メチオニンと2.28%(W
- 20 /W)アンモニアを含む水溶液(pH9.5)に懸濁した。その菌体懸濁液300gを30℃に保温された500ml容量の3口フラスコに入れ、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを毎時5.5gの速度で攪拌しながら連続的に添加した。一方、精密濾過膜(旭化成製microz PMP-003)を用いて連続的に菌体を濾過し、反応濾液
- 25 を毎時約54gの速度で回収した。その際、反応容器内の液量が減少しないように、液面センサーに連動したポンプを用いて回収した反応濾液

と同容量の 1. 14 % (W/W) アンモニア水を連続的に補給した。回収反応濾液の DL-メチオニン濃度を、高速液体クロマトグラフィー(カラム: TSK gel ODS-80TM、キャリア: エタノール/水/トリフルオロ酢酸 = 5/95/0.04) を用いて 1 時間毎に測定し、

5 10 % (W/W) 濃度を維持するように反応濾液の回収速度をコントロールした。反応濾液に含まれる 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルの濃度は徐々に増加して反応開始後 8 時間で 0.4 % (W/W) に達した後、その濃度は 8 日間維持され、その間のメチオニン生産速度は毎時 5.36 g であった。

10

実施例 3 (固定化 NSSC 204 株による DL-メチオニンの連続生産)

(NSSC 204 株の固定化)

実施例 1 で得られたアースロバクター NSSC 204 株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体として 10 % (W/W) 濃度となるように 1 % (W/W) アルギン酸ナトリウム水溶液に懸濁した。次いでその懸濁液を 0.1 M 塩化カルシウム水溶液に滴下して固定化菌体ビーズを作製した。得られた固定化菌体ビーズ 225 g を内径 30 mm のカラムに充填し、10 % (W/W) DL-メチオニンと 2.2

15 8 % (W/W) アンモニアと 2.5 mM 1, 3-ジアミノプロパンと 10 mM 塩化カルシウムを含む水溶液 (pH 9.5) を毎時 0.2 l の流速で 1 l 流して平衡化した。次いでビーズを 30 °C に保温された 500 ml 容量の 3 口フラスコに移し、平衡化水溶液を加えて全量を 300 g とした後、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルを毎時 5.16

20 5 g の速度で攪拌しながら連続的に添加した。一方、反応液は固定化ビーズを吸い込まないようにサクションフィルターを通して毎時約 50 g の

速度で回収した。その際反応容器内の液量が減少しないように、液面センサーに連動したポンプを用いて回収した反応濾液と同容量の 1. 14 % (W/W) アンモニアと 20 mM エチレンジアミンと 10 mM 塩化カルシウムを含む水溶液を連続的に補給した。回収反応濾液の DL-メチオニン濃度を、高速液体クロマトグラフィー（カラム：TSK gel ODS-80 TM、キャリア：エタノール／水／トリフルオロ酢酸＝5／95／0.04）を用いて 1 時間毎に測定し、10 % (W/W) 濃度を維持するように反応濾液の回収速度をコントロールした。反応濾液に含まれる 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルの濃度は徐々に増加して反応開始後 12 時間で 0.5 % (W/W) に達した後、その濃度は 20 日間維持され、その間のメチオニン生産速度は毎時 5.03 g であった。

実施例 4（固形 DL-メチオニンの回収）

15 菌体を分離した反応液 250 g（メチオニン 25 g，2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル 1.25 g，アンモニア 2.3 % を含有）を攪拌機を付した 500 mL フラスコに仕込み、真空ポンプを使用し、加熱することなく減圧下にアンモニアを留去した。アンモニアの留去により析出したメチオニンを濾別し、メチオニン 11.3 g を得た。母液にはメチオニン 13.7 g と 1.25 g の 2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルが含まれており、分解物は生成していなかった。この母液を用いて菌体反応-晶析を繰返し実施したが、得られるメチオニンの収率は 99 % と定量的であり、純度も 99 % 以上で着色も認められなかった。

25 実施例 5（固定化 IFO 15564 株による DL-メチオニンの連続生

産)

(IFO15564株の培養と固定化)

トリプトン1.0%、酵母エキス0.5%、食塩1.0%を含む培地2mlを試験管にとり121℃で20分間滅菌した。この試験管にロドコッカス・ロドクロスIFO15564株を一白金耳植菌し、30℃で一晩振盪培養し、前培養物を調製した。次いで、コーンスチープリカー(濾過滅菌)2.0%、スクロース(121℃で20分間滅菌)1.0%、 ϵ -カプロラクタム(121℃で20分間滅菌)0.5%を含むpH7.2(2N苛性ソーダで調整)の培地20mlを100ml容量のバッフル付き三角フラスコに入れ、上記の前培養物0.2mlを植え継ぎ、さらに3日間30℃で振盪培養した。得られたロドコッカス・ロドクロスIFO15564株の培養液を遠心分離し、イオン交換水で洗浄した後、乾燥菌体として10%(W/W)濃度となるように1%(W/W)アルギン酸ナトリウム水溶液に懸濁した。次いでその懸濁液を0.1M塩化カルシウム水溶液に滴下して固定化菌体ビーズを作製した。

(DL-メチオニンの連続生産)

得られた固定化菌体ビーズ225gを内径30mmのカラムに充填し、10%(W/W)DL-メチオニンと2.28%(W/W)アンモニアと10mM塩化カルシウムを含む水溶液を毎時0.2lの流速で1l流して平衡化した。次いでビーズを35℃に保温された500ml容量の3口フラスコに移し、平衡化水溶液を加えて全量を300gとした後、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミドを毎時11.54gの速度で攪拌しながら連続的に添加した。一方、反応液は固定化ビーズを吸い込まないようにサクションフィルターを通して毎時約105gの速度で回収した。その際、反応容器内の液量が減少しないように、液面センサーに連動したポンプを用いて回収した反応濾液と同容量の1.14%(W

／W) アンモニアと 10 mM 塩化カルシウムを含む水溶液で連続的に補給した。回収反応濾液の DL-メチオニン濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80TM、キャリア: アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸 = 50／950／1) を用いて 1 時間
5 毎に測定し、10% (W／W) 濃度を維持するように反応濾液の回収速度をコントロールして、14 日間の連続反応を行った。その間のメチオニン生産速度は平均で毎時 10.57 g であった。

実施例 6 (固形 DL-メチオニンの回収)

10 実施例 5 で得られる反応濾液を 250 g サンプリングし、攪拌機付の 500 ml フラスコに仕込み、真空ポンプを使用し、減圧下にアンモニアを留去した。アンモニアの留去により析出したメチオニンを濾別し、メチオニン 11.3 g を得た。母液にはメチオニン 13.7 g と 1.0
15 2 g の 2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミドが含まれており、分解物は生成していなかった。この母液を用いて菌体反応-晶析を繰り返して実施したが、得られるメチオニンは 99% と定量的であり、純度も 99% 以上で着色も認められなかった。

産業上の利用可能性

20 本発明によれば、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミド等を原料とし、ニトリル加水分解活性、アミド加水分解活性等を有する生体触媒を用いて、アンモニア水中にメチオニンを溶解状態で生成させ、その後アンモニアを留去して製品形態として要求される固形メチオニンを高効率かつ簡便に製造できる。
25 しかも、従来の化学的製造法に比べて格段にエネルギーコスト・廃棄物排出量が低い。

請 求 の 範 囲

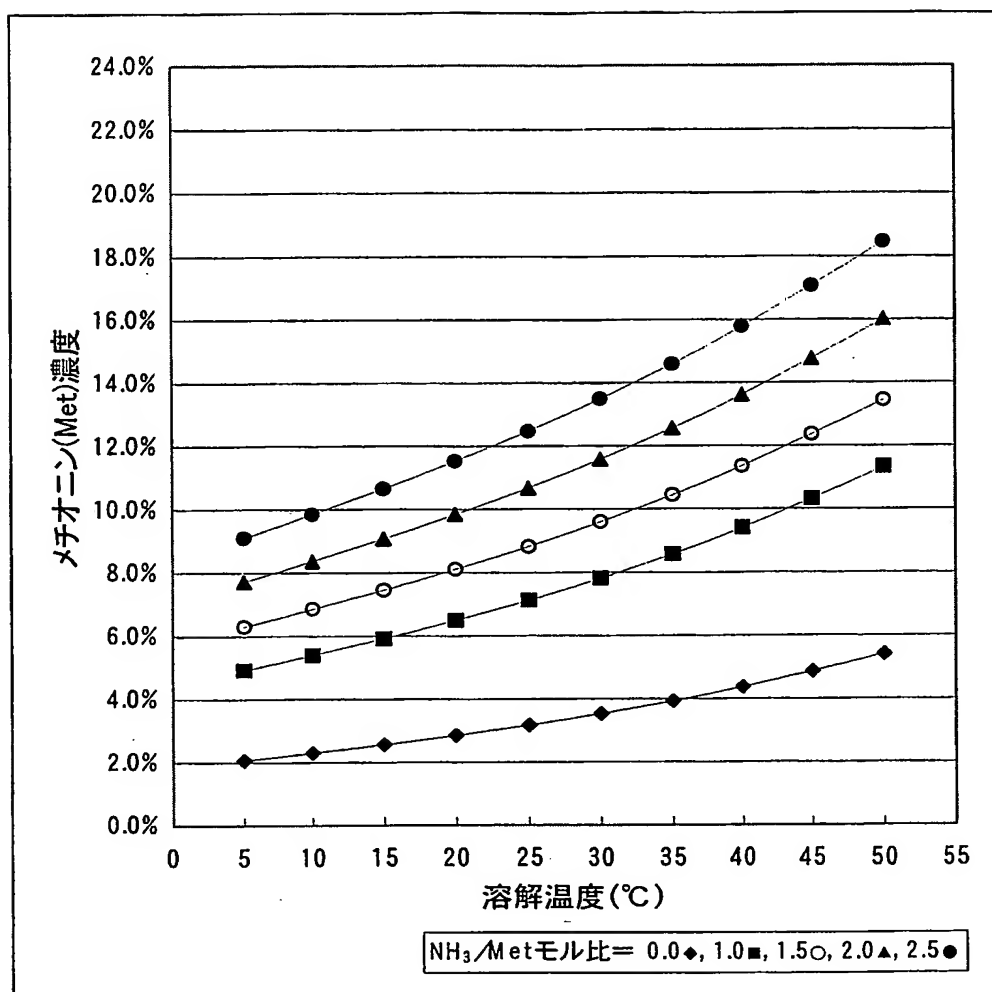
1. (1) 加水分解によりメチオニンを生成しうる原料物質をアンモニア水溶液中で加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解して含メチオニンアンモニア水溶液に変換する第1の工程、(2) 前記第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液を生体触媒と分離する第2の工程、(3) 前記第2の工程で分離された含メチオニンアンモニア水溶液よりアンモニアを留去しメチオニン結晶を析出・分離する第3の工程を有することを特徴とするメチオニンの製造法。
- 10 2. 原料物質としての2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリルをアンモニア水溶液中でニトリル加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解することを特徴とする請求項1記載のメチオニンの製造法。
3. 原料物質としての2-アミノ-4-メチルチオブタン酸アミドをアンモニア水溶液中でアミド加水分解活性を有する生体触媒によって加水分解することを特徴とする請求項1記載のメチオニンの製造法。
- 15 4. アンモニア水溶液として、第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液中のメチオニン量の1.5～10倍当量のアンモニアを含む水溶液を用いることを特徴とする請求項1から3のいずれか記載のメチオニンの製造法。
- 20 5. 第1の工程で得られる含メチオニンアンモニア水溶液中のメチオニン濃度が5～30重量%であることを特徴とする請求項1から4のいずれか記載のメチオニンの製造法。
6. 生体触媒を再利用することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のメチオニンの製造法。
- 25 7. 生体触媒として、固定化菌体を用いることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のメチオニンの製造法。

8. メチオニン結晶を分離回収した母液、及び留去されたアンモニアを加水分解反応に再利用することを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のメチオニンの製造法。

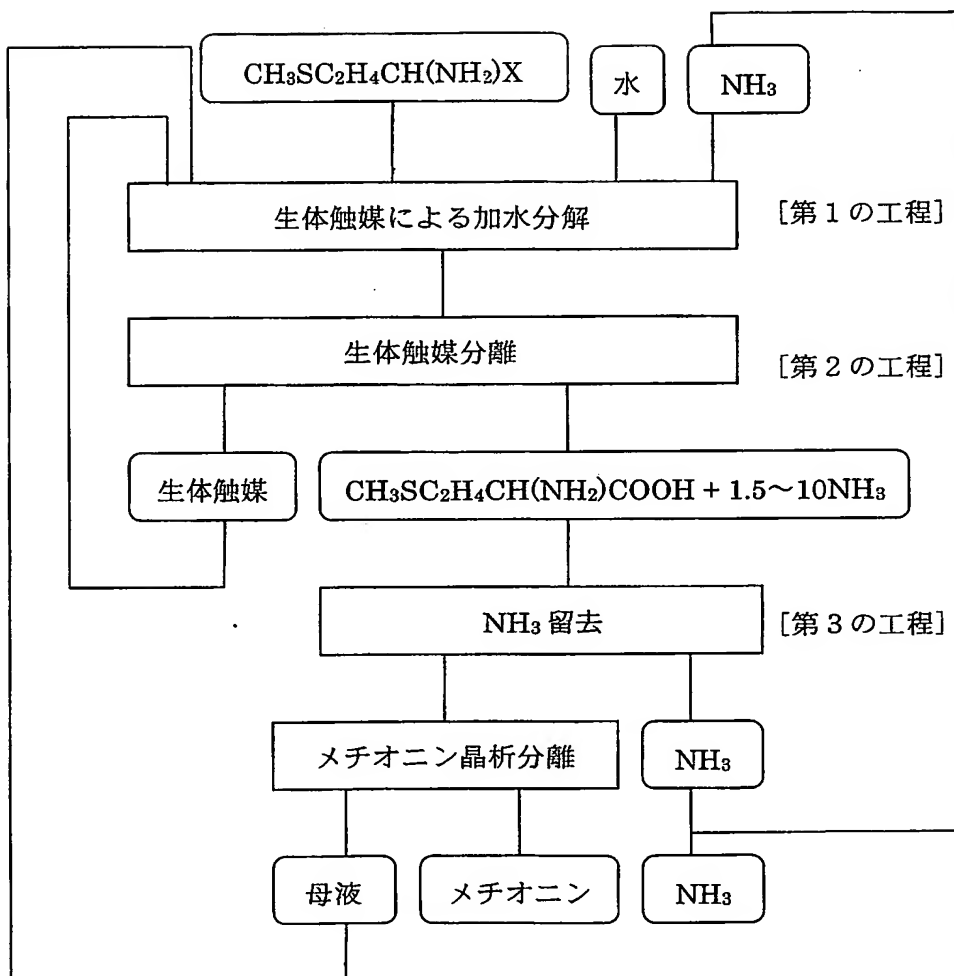
9. 第1の工程を加圧下で実施することを特徴とする請求項1～8のいずれか記載のメチオニンの製造法。

5

第 1 図



第 2 図

 $X = \text{CN or CONH}_2$ 

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 13/12, C07C319/28, 323/58

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 13/12, C07C319/28, 323/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS (STN), REGISTRY (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	US 5587303 A (NIPPON MINING COMPANY, LTD.) 1996. 12. 24 全文 & JP 4-79895 A	1-2, 4-9/3
Y/A	WO 01/48234 A1 (旭化成株式会社) 2001. 07. 05 全文 & EP 1243657 A1 & US 2003/0040085 A1 & JP 2001-548746 A	1-2, 4-9/3
Y/A	JP 3-280895 A (日東化学工業株式会社) 1991. 12. 11 全文 (ファミリーなし)	1-2, 4-9/3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 10. 03

国際調査報告の発送日

21. 11. 03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	WO 02/08439 A1 (日本曹達株式会社) 2002. 01. 31 全文 & JP 2002-513922 A	1-2, 4-9/3
A	WO 80/01571 A1 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE) 1980. 08. 07, 全文 & EP 23214 A & US 4366250 A & JP 56-500319 A	1-9
A	JP 9-9973 A (チッソ株式会社) 1997. 01. 14 全文 (ファミリーなし)	1-9
A	WO 00/27809 A1 (RHONE-POULENC ANIMAL NUTRITION) 2000. 05. 18 全文 & EP 1124799 A1 & US 6417395 B1 & JP 2003-524608 A	1-9
A	JP 9-140391 A (日東化学工業株式会社) 1997. 06. 03 全文 (ファミリーなし)	1-9
PA	WO 03/27303 A1 (日本曹達株式会社) 2003. 04. 03 全文 (ファミリーなし)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P13/12, C07C319/28, 323/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P13/12, C07C319/28, 323/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS (STN), REGISTRY (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	US 5587303 A (NIPPON MINING CO., LTD.), 24 December, 1996 (24.12.96), Full text & JP 4-79895 A	1-2, 4-9/3
Y/A	WO 01/48234 A1 (Asahi Kasei Corp.), 05 July, 2001 (05.07.01), Full text & EP 1243657 A1 & US 2003/0040085 A1 & JP 2001-548746 A	1-2, 4-9/3
Y/A	JP 3-280895 A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 11 December, 1991 (11.12.91), Full text (Family: none)	1-2, 4-9/3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
21 October, 2003 (21.10.03)

Date of mailing of the international search report
11 November, 2003 (11.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09268

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 02/08439 A1 (Nippon Soda Co., Ltd.), 31 January, 2002 (31.01.02), Full text & JP 2002-513922 A	1-2, 4-9/3
A	WO 80/01571 A1 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LARECHERCHE), 07 August, 1980 (07.08.80), Full text & EP 23214 A & US 4366250 A & JP 56-500319 A	1-9
A	JP 9-9973 A (Chisso Corp.), 14 January, 1997 (14.01.97), Full text (Family: none)	1-9
A	WO 00/27809 A1 (RHONE-POULENC ANIMAL NUTRITION), 18 May, 2000 (18.05.00), Full text & EP 1124799 A1 & US 6417395 B1 & JP 2003-524608 A	1-9
A	JP 9-140391 A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 03 June, 1997 (03.06.97), Full text (Family: none)	1-9
P,A	WO 03/27303 A1 (Nippon Soda Co., Ltd.), 03 April, 2003 (03.04.03), Full text (Family: none)	1-9